

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO

HENRIQUE MALAGODI CALIARI

**Efeitos no reparo ósseo da associação da
fotobiomodulação com compósitos de
biovidro/colágeno/magnésio**

SANTOS

2017

HENRIQUE MALAGODI CALIARI

Efeitos no reparo ósseo da associação da fotobiomodulação com
compósitos de biovidro/colágeno/magnésio

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Universidade Federal
de São Paulo como parte dos
requisitos para obtenção do título de
bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto
Gabbai Armelin.

Co-Orientadora: Prof^ª. Dr^a Ana
Cláudia Muniz Renno.

SANTOS

2017

Sumário

RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO	6
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVO	12
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
4.1. TRATAMENTOS	13
4.1.1. <i>fotobiomodulação.....</i>	<i>13</i>
4.1.2. <i>Biovidro</i>	<i>13</i>
4.1.3. <i>Colágeno</i>	<i>13</i>
4.1.4. <i>Magnésio</i>	<i>13</i>
4.2. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	13
4.3. ESTUDOS <i>IN VIVO</i>	14
4.3.1. <i>Animais utilizados nos experimentos</i>	<i>14</i>
4.3.2. <i>Grupos experimentais</i>	<i>14</i>
4.3.3. <i>Modelo experimental de defeitos ósseos em tíbias de ratos</i>	<i>15</i>
4.3.4. <i>Colocação dos implantes.....</i>	<i>16</i>
4.3.5. <i>Eutanásia</i>	<i>16</i>
5. ANÁLISES.....	17
5.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA	17
5.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	17
5.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	17
5.3.1. <i>Análise qualitativa</i>	<i>18</i>
5.3.2. <i>Análise semi-quantitativa</i>	<i>18</i>
6. ANÁLISE DOS DADOS.....	18
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
7.1. ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	19
7.2. ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	20
7.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	21
7.3.1. <i>Análise qualitativa</i>	<i>21</i>
7.3.2. <i>Análise semi-quantitativa</i>	<i>24</i>
8. CONCLUSÃO	26
9. REFERÊNCIAS	27

RESUMO

Durante o processo de reparo ósseo, cerca de 5 a 10% dos casos podem culminar em um processo de consolidação anormal e resultar em não união óssea. Esse fato está relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade e elevados custos ao sistema de saúde. Desta forma, faz-se necessária a investigação de tratamentos que apresentem potencial osteogênico, acelerando o processo de reparo. Dentre estes recursos, pode-se evidenciar a aplicação de biomateriais como, por exemplo, o biovidro e a utilização deste com outros materiais, dentre eles, o magnésio e o colágeno, mimetizando o osso natural. Além disso, a fotobiomodulação é amplamente utilizado para acelerar o metabolismo ósseo e a associação deste recurso com os biomateriais vem sendo investigada por alguns autores. No entanto, não existem estudos que demonstrem a utilização desses recursos associados no processo de reparo ósseo. Desta forma, o objetivo do presente estudo é avaliar, através de testes *in vivo*, os efeitos da fotobiomodulação associado a compósitos de biovidro/colágeno/magnésio no reparo de defeitos ósseos em tíbias de ratos. Foram utilizados ratos Wistar machos, submetidos a cirurgia para realização do defeito ósseo em ambas as tíbias e divididos em 4 grupos: (i) biovidro/magnésio; (ii) biovidro/colágeno/magnésio; (iii) biovidro/magnésio + fotobiomodulação; (iv) biovidro/colágeno/magnésio + fotobiomodulação. Os animais foram eutanaziados no 15º dia pós-cirúrgico para realização de análises histopatológica, morfométrica e imunohistoquímicas. Resultados histológicos indicam uma degradação inicial do biomaterial, acompanhada de neoformação óssea, principalmente na periferia do defeito. Partículas do material podiam ser encontradas em diferentes partes do defeito, no entanto, de maneira menos acentuada nos grupos com fotobiomodulação quando comparados aos grupos não associados a este recurso terapêutico. Vale ressaltar que também foi encontrado um tecido de granulação mais evidente e organizado nos grupos associados a fotobiomodulação. As imunomarcações para RUNX2 e RANKL foram detectadas em todos os grupos. Embora foi observado que a fotobiomodulação não foi capaz de, inicialmente, modular os efeitos de tais compósitos, em termos de morfometria óssea e expressão de fatores osteogênicos, pode-se dizer que a associação a essa fototerapia teve um efeito benéfico, levando a degradação do biomaterial e substituição do mesmo por um tecido de granulação organizado.

Palavras-chave: Biovidro; Colágeno; Magnésio; Fotobiomodulação; Reparo ósseo.

ABSTRACT

During bone repair, 5 to 10% of the cases may culminate in abnormal consolidation, and, even, non-union. This fact is related to high morbidity and mortality rates, leading to high expenses to the health system. So, the investigation of new treatments which have osteogenic potential, accelerating the bone repair, are quite necessary. For this purpose, the application of some biomaterials has been in evidence, for instance, bioglass, as well as, its use in combination with other materials, like magnesium and collagen, mimicking natural bone. Moreover, fotobiomodulation has been widely used in order to accelerate the bone metabolism, and the association of this therapy with biomaterials has been investigated by some authors. Nevertheless, there is a lack of studies which demonstrate the utilization of these resources in association toward bone repair. Thus, the aim of this study was to evaluate, through *in vivo* studies, the effects of fotobiomodulation associated to bioglass/collagen/magnesium composites on the repair of tibiae bone defects in rats. Male Wistar rats were submitted to surgery for creating the bone defect in both tibiae, and they were divided into 4 groups: (i) bioglass/magnesium; (ii) bioglass/collagen/magnesium; (iii) bioglass/magnesium + fotobiomodulação; (iv) bioglass/collagen/magnesium + fotobiomodulação. The animals were euthanized 15 days post-surgery for histopathological, morphometrical and immunohistochemistry analysis. Histological findings indicate an initial degradation of the biomaterials, accompanied by new bone formation, mainly in the periphery of the defect. Particles of the material could be found in different parts of the defect, but in a less pronounced manner for groups with fotobiomodulation when compared to the groups which were not associated to this therapeutic resource. It is worth mentioning that a more evident and organized granulation tissue was found in the groups associated to fotobiomodulation. Immunolabeling for RUNX2 and RANKL were detected for all groups. Although it was observed that fotobiomodulation was not initially capable of modulating the effects of the composites in terms of bone morphometry and osteogenic factors expressions, the association to this phototherapy provided a beneficial effect, leading to the biomaterial degradation and its substitution by an organized granulation tissue.

Keywords: Bioglass; Collagen; Magnesium; Fotobiomodulation; Bone repair.

1. INTRODUÇÃO

O reparo ósseo é um processo altamente complexo que se inicia após um estímulo de lesão (TSIRIDIS, UPADHYAY e GIANNOUDIS, 2007). Este processo consiste na ativação de uma cascata de eventos biológicos a qual envolve a ativação de genes, interação de células, fatores de crescimento e matriz extracelular (SCHINDELER *et al.*, 2008). No entanto, 5 a 10% dos casos de fraturas podem culminar em um processo de consolidação anormal e resultar em um atraso na consolidação ou não união óssea (CALORI *et al.*, 2007). As ocorrências destes casos refletem diretamente na perda da produtividade e independência do indivíduo, além de ocasionar um aumento dos gastos públicos (AARON, CIOMBOR e SIMON, 2004). Estima-se que cerca de 25 mil dólares são gastos com casos de pseudoartroses nos Estados Unidos (WIESE e PAPE, 2010).

Diante deste contexto, diferentes recursos terapêuticos têm sido investigados na tentativa de prevenir e/ou minimizar o surgimento de complicações advindas do processo de consolidação anormal (HADJIARGYROU *et al.*, 1998). Alguns recursos vêm apresentando resultados positivos na aceleração da consolidação de fraturas. Dentre estes, podem ser citados a aplicação de ultrassom terapêutico de baixa intensidade (COORDS *et al.*, 2011), uso de campos eletromagnéticos (JING *et al.*, 2011), aplicação de proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) (SHYNG *et al.*, 2010), fotobiomodulação (FERNANDES *et al.*, 2013; PATROCINIO-SILVA *et al.*, 2014; TIM *et al.*, 2014), além dos materiais bioativos osteogênicos, como metais, cerâmicas e polímeros (HADJIARGYROU *et al.*, 1998; HENCH e POLAK, 2002; MOURA *et al.*, 2007).

O biomaterial ou material bioativo pode ser definido como um material capaz de produzir uma resposta biológica específica em uma interface material/tecido - formando uma forte ligação entre esses – sem induzir toxicidade ou resposta inflamatória acentuada (HENCH e POLAK, 2002; HENCH e WILSON, 2013).

Dentre os biomateriais mais utilizados, estão os vidros bioativos (Bioactive Glasses; BGs). Tais BGs, quando em contato com o tecido biológico e na presença de fluidos corpóreos, desenvolvem uma camada de hidroxicarbonatoapatita (HCA) na sua superfície, promovendo uma ligação química extremamente forte entre o tecido e o implante, a qual imita o tipo de interface formada pelos processos naturais de reconstrução dos tecidos, além de ser química e estruturalmente equivalente à fase mineral do osso (XYNOS *et al.*, 2000; HENCH e POLAK, 2002; HENCH e WILSON,

2013). Pesquisas também demonstram que os produtos iônicos de vidro bioativos são capazes de estimular a expressão de genes relacionados aos processos de diferenciação e proliferação de células da linhagem osteoblástica (XYNOS *et al.*, 2000; HENCH, 2006), podendo assim contribuir para a regeneração óssea.

No entanto, apesar do biovidro demonstrar um grande potencial osteogênico e resultados positivos na aceleração da consolidação óssea, esse biomaterial apresenta propriedades mecânicas reduzidas (XYNOS *et al.*, 2000; CHEN, ROETHER e BOCCACCINI, 2008; HENCH e WILSON, 2013). Com isso, a utilização deste na forma de compósitos, associados a outros materiais (FUJISHIRO, HENCH e OONISHI, 1997; NAVARRO *et al.*, 2004) como, por exemplo, o magnésio, constituiria uma terapêutica com características mais próximas do tecido ósseo.

Acredita-se que a adição de um componente metálico, como o magnésio, poderia potencializar as propriedades mecânicas, principalmente, tratando-se de possíveis substitutos ósseos. O magnésio é o quarto cátion mais abundante do corpo humano e vem demonstrando ser um promissor componente para os compósitos de biomateriais (HAN *et al.*, 2013). O magnésio tem se destacado por apresentar várias vantagens, principalmente em aplicações no tecido ósseo (WITTE *et al.*, 2005). É evidenciado que biomateriais com este cátion apresentam características biomecânicas similares ao do osso humano, como tenacidade e módulo de elasticidade (HAN *et al.*, 2013).

Estudo realizado por Huan *et al.* (2012) demonstrou que compósitos de bioglass/magnésio são citocompatíveis. Além disso, estes possuem propriedades para estimular a diferenciação e proliferação de células osteoblásticas quando comparado somente com o magnésio. Em outro estudo, Han *et al.* (2013) analisaram uma liga de magnésio e cálcio, evidenciando um aumento das propriedades biomecânicas, aumento da taxa de biodegradação, baixo potencial de corrosão e alta biodegradação.

Apesar do aumento das propriedades mecânicas do biovidro com a inserção de magnésio, acredita-se também que a adição de um componente da matriz extracelular orgânica, como colágeno, poderia favorecer a diferenciação de células osteogênicas, constituindo uma ótima estratégia, principalmente por mimetizar a composição e estrutura do osso humano (KWAK, 2013).

O colágeno é o principal componente da matrix orgânica do tecido ósseo (OH *et al.*, 2014). A microarquitetura deste componente permite força e rigidez ao tecido (KWAK, 2013), garantindo suporte para manter a integridade estrutural de vários componentes corporais (KROON, 2010). Além disso, é evidenciado, no tecido ósseo,

que implantes de colágeno favorecem o processo de diferenciação de células progenitoras em osteoblastos (SUN *et al.*, 2014). Wheeler *et al.* (2013) constataram que compósitos de elastina/bioglass/colágeno viabilizaram a atividade da fosfatase alcalina em cultura de células osteoblásticas. Estudo realizado por Sun *et al.* (2014) demonstrou que *scaffolds* de colágeno promoveram uma maior expressão de RUNX2 (*Runt-related transcription factor 2*) e osteocalcina em cultura de células osteoblásticas.

De acordo com o exposto acima, alguns materiais, ou até mesmo a união deles na forma de compósitos, apresentam propriedades similares as do tecido ósseo, sendo que alguns deles são, inclusive, bioativos e podem estimular o metabolismo desse tecido. Apesar dessas características, em situações onde há extensa perda de tecido ósseo (fraturas de grande extensão) ou condições patológicas associadas, como no caso de osteoporose, esses materiais podem não ser suficientes para estimular a consolidação óssea, sendo necessárias outras intervenções. Com isso, a utilização de biomateriais associados a recursos físicos, potencialmente osteogênicos, pode constituir uma terapêutica mais eficaz para o tratamento de fraturas de difícil consolidação. Dentre esses recursos, podemos destacar o uso da fotobiomodulação (COORDS *et al.*, 2011; JING *et al.*, 2011; PATROCINIO-SILVA *et al.*, 2014; TIM *et al.*, 2014).

A fotobiomodulação é definido como uma bioestimulação não térmica com emissão de luz monocromática e coerente, e saída de energia de baixa intensidade (SEZER *et al.*, 2012). Os efeitos benéficos da aplicação da fotobiomodulação em diversas desordens musculoesqueléticas estão muito bem elucidados na literatura (BOSSINI *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2013), incluindo os efeitos no tecido ósseo (RENNO *et al.*, 2007; FAVARO-PIPI *et al.*, 2010; FAVARO-PIPI *et al.*, 2011; PATROCINIO-SILVA *et al.*, 2014).

Em um estudo *in vitro*, Renno *et al.* (2007) demonstraram que a aplicação de fotobiomodulação (830 nm; 30 mW; 10 J/cm²) promoveu um aumento significativo da proliferação de osteoblastos, quando comparado com as células que não receberam irradiação. Ainda, Fávaro-Pípi *et al.* (2010) , em um estudo experimental *in vivo*, demonstraram que durante a consolidação óssea, a fotobiomodulação favoreceu o reparo ósseo, sendo evidenciado por um aumento de trabéculas maduras, deposição de tecido ósseo e tecido conjuntivo altamente vascularizado na região do defeito. Bossini *et al.* (2012) observaram que a fotobiomodulação foi um potente estimulador da neoformação óssea, além de levar ao aumento da síntese e deposição de colágeno em ratas osteopênicas.

Ainda, baseado nos efeitos positivos tanto dos biomateriais supracitados quanto da fotobiomodulação, alguns trabalhos têm sido devolvidos investigando os efeitos da associação de ambos os tratamentos, com o intuito de aproveitar o grande potencial regenerativo de ambas as intervenções terapêuticas nos tecidos biológicos. Dentro dessa linha de associação de diferentes biomateriais e modalidades terapêuticas, Bossini *et al.* (2011), associando um material bioativo a fotobiomodulaçãoterapia, observaram um aumento na formação óssea, aumento da angiogênese e uma maior deposição de colágeno em defeitos ósseos em tíbias de ratas osteoporóticas, após um período de 15 dias. Freddo *et al.* (2009) demonstraram que a associação da fotobiomodulaçãoterapia e polímeros aumentaram a vascularização, a proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno no sítio de fratura em fêmures de ratos. Em um estudo mais recente, Renno *et al.* (2015) demonstraram que houve um aumento da proliferação das células do bulbo olfatório cultivadas nos *scaffolds* de colágeno e irradiadas com fotobiomodulação (aumento de 13,2% na proliferação celular das células irradiadas quando comparada com o grupo sem irradiação), indicando que a associação das intervenções terapêuticas apresentou um melhor resultado para o crescimento celular (RENNO *et al.*, 2015).

Com isso, existem claras evidências de que a fotobiomodulação e os biomateriais são capazes de estimular células osteogênicas e promover uma aceleração no processo de reparo. No entanto, há uma escassez na literatura de estudos que abordem a associação de biomateriais e fotobiomodulação. Desta forma, faz-se necessária a realização de estudos detalhados que verifiquem os efeitos dessa associação. Ainda, vale a pena ressaltar que não existe na literatura estudos *in vivo* que avalie a performance biológica da fotobiomodulação, associado a compósitos de biovidro/colágeno/magnésio, durante o reparo ósseo. Diante do exposto, a hipótese do presente projeto é que a aplicação dos compósitos de biovidro/colágeno/magnésio, associados a fotobiomodulação, acelere o processo de reparo ósseo em defeitos tíbiais de ratos, através da combinação da bioatividade do material com os efeitos benéficos da fotobiomodulação na região de lesão.

2. JUSTIFICATIVA

Diante do contexto explanado, torna-se evidente que fraturas de difícil consolidação e defeitos ósseos de grandes extensões estão associados a uma substancial incapacidade física para os indivíduos acometidos. Dados apontam que cerca de 5% a 10% das fraturas culminam em não consolidação óssea (CALORI *et al.*, 2007), relacionando-se a um elevado custo socioeconômico.

Assim, a realização de estudos direcionados ao desenvolvimento de terapêuticas, as quais favoreçam o reparo ósseo e minimizem o tempo de consolidação, são de extrema importância, uma vez que os mesmos podem resultar em uma redução das complicações (morbidade e mortalidade) e custos advindos dos casos de fraturas ósseas.

Nos últimos anos, a fotobiomodulação e os biomateriais vêm surgindo como recursos promissores no tratamento de fraturas ósseas devido a seus custos relativamente baixos e a capacidade deste recurso em estimular a osteogênese. Dessa maneira, torna-se evidente que o desenvolvimento de materiais com características semelhantes ao tecido ósseo, associados à irradiação fotobiomodulação, pode constituir uma alternativa promissora para o tratamento de fraturas ósseas, principalmente de difícil consolidação.

Como exposto acima, o biovidro, magnésio e colágeno são biomateriais amplamente investigados no tratamento de fraturas ósseas, principalmente em trabalhos experimentais e seus efeitos benéficos para o tecido ósseo já foram evidenciados. No entanto, não existem dados na literatura a respeito da performance biológica destes materiais quando utilizados em conjunto, na forma de compósitos, bem como, na presença da irradiação fotobiomodulação.

Assim, em suma, este projeto visa gerar informações importantes a respeito dos efeitos da fotobiomodulação associado aos biomateriais, com o intuito de desenvolver intervenções mais eficazes para o tratamento de afecções que acometem o tecido ósseo. Para isso, serão realizados testes essenciais que irão avaliar a possível existência de reações indesejadas. Essa avaliação biológica *in vivo* dos diferentes tipos de terapias, associados ou não, é indispensável, pois verifica a existência de um potencial tóxico que possa perturbar o sistema celular, a qual levaria a inibição do crescimento e/ou morte das células, podendo desencadear diversos problemas ao organismo.

Espera-se, ainda, que o desenvolvimento deste projeto resulte em benefícios econômicos e sociais para a população brasileira, já que a elucidação dos mecanismos envolvidos na interação destes com o tecido ósseo poderá determinar o

desenvolvimento de tratamentos mais efetivos e seguros, os quais poderão ser aplicados em ampla escala no tratamento de indivíduos portadores de fraturas de difícil consolidação.

3. OBJETIVO

O objetivo deste projeto é avaliar, através de testes *in vivo*, o efeito da fotobiomodulação associado a compósitos de biovidro/colágeno/magnésio no reparo de defeitos ósseos em tíbias de ratos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado no departamento de Biociências da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - campus Baixada Santista.

4.1. Tratamentos

4.1.1. fotobiomodulação

Os protocolos de tratamento com fotobiomodulação foram iniciados imediatamente após os procedimentos cirúrgicos com os seguintes parâmetros: potência de saída de 30 mW, 808 nm, tempo de 94s, 2,8 J e fluência de 100 J/cm². Os tratamentos foram realizados três vezes por semana, às segundas, quartas e sextas-feiras. Foi utilizado um ponto de aplicação sobre o defeito ósseo. Nas aplicações, foi utilizada a técnica pontual em contato, sendo a caneta do equipamento posicionada perpendicularmente ao tecido e as irradiações realizadas sempre no mesmo horário. A eutanásia dos animais ocorreu 24 horas após a última sessão de tratamento.

4.1.2. Biovidro

O BG utilizado nesse estudo foi produzido e fornecido pelo Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais do IPEN, em colaboração com os professores Dr. Francisco Braga e Dr. Antônio Carlos da Silva. O BG foi obtido a partir da fusão dos componentes (pesados e homogeneizados) em forno elétrico (Forno Lindberg Blue vertical super kanthal - EUA) a 1500 °C durante 2 horas. Após a homogeneização do fundido, a solução foi arrefecida em água deionizada e o vidro resultante foi submetido a um processo de moagem até a obtenção de um pó com granulometria média de 125 a 250 µm.

4.1.3. Colágeno

Como componente orgânico dos compósitos (BG/Col) foi utilizado colágeno tipo I liofilizado de tendão bovino fornecido pela USBiological Life Sciences, EUA (KARAGEORGIOU e KAPLAN, 2005). As fibras colagênicas foram processadas por meio de moinho criogênico e peneiradas para obtenção da granulometria < 500 µm.

4.1.4. Magnésio

No presente estudo foram utilizadas micropartículas de magnésio comercialmente disponíveis (74 a 105 µm, pureza de 99,6%; Alfa Aesar, Massachusetts, USA).

4.2. Preparação das amostras

Para a manufatura dos compósitos de BG/Mg e BG/Col/Mg utilizados no trabalho (associados ou não a fotobiomodulação), os materiais foram adicionados em

diferentes proporções de acordo com cada grupo (Tabela 1). Carboximetilcelulose (CMC) foi utilizada como agente porogênico e o polimetilmetacrilato (PMMA) para agregar os materiais. Todos os materiais, em pó, foram pesados e misturados em um recipiente, usando-se uma espátula. Após, água foi adicionada e a combinação foi misturada novamente. A mistura foi rapidamente transferida para um molde de silicone de 3 x 1 mm (diâmetro x altura) afim de se produzir os *scaffolds* para implantação *in vivo*. Subsequentemente, os moldes foram vedados e submetidos a uma câmara de pressão a ar à 0,6 MPa por 30 min. Por final, a vedação foi removida dos moldes e os mesmos foram submetidos a vácuo (10^{-3} Torr) por 15 min e secados a temperatura

Tabela 1. Formulações experimentais dos compósitos de BG/Mg BG/Col/Mg.

Grupos	PMMA (wt%)	MMA (wt%)	Biovidro (wt%)	Colágeno (wt%)	Magnésio (wt%)	CMC (wt%)	Água (wt%)
BG/Mg	13,28	26,57	22,97	0,00	2,94	2,42	31,83
BG/Col/Mg	13,80	27,59	15,43	4,56	3,05	2,51	33,05

ambiente.

wt% - *weight percentage*: porcentagem em peso.

4.3. Estudos *in vivo*

Os estudos foram conduzidos conforme o Guia de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório e com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFESP (n. 8007051116).

4.3.1. Animais utilizados nos experimentos

Para a realização dos experimentos foram utilizados 80 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem Wistar, machos, com três meses de idade e cerca de 300 g de massa corporal média, provenientes do Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da UNIFESP. Os animais permaneceram em biotério apropriado da Guarda de Animais do Campus Baixada Santista da UNIFESP, em gaiolas de polipropileno padrão ($n = 4$) e mantidos em ambiente higienizado. A iluminação foi de ciclo claro/escuro de 12 horas e os animais receberam água e ração balanceada à vontade.

4.3.2. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- Grupo 1 (BG/Mg) – Grupo biovidro/magnésio: os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e receberam implante de biovidro associado ao Mg. O BG/Mg é composto por 10 animais, com eutanásia no 15º dia pós-cirúrgico.
- Grupo 2 (BG/Col/Mg) – Grupo biovidro/colágeno/magnésio: os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e receberam implante de biovidro associado ao colágeno e magnésio. Tal grupo é composto por 10 animais com eutanásia no 15º pós-cirúrgico.
- Grupo 3 (BG/Mg + fotobiomodulação) – Grupo biovidro/magnésio + fotobiomodulação: os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e receberam implante de biovidro associado ao magnésio, além da aplicação de fotobiomodulação (808 nm; 30 mW; 100 J/cm²). Tal grupo é composto por 10 animais com eutanásia no 15º dia pós-cirúrgico.
- Grupo 4 (BG/Col/Mg + fotobiomodulação) – Grupo biovidro/colágeno/magnésio + fotobiomodulação: os ratos deste grupo foram submetidos ao defeito ósseo e receberam o implante de biovidro associado ao colágeno e magnésio, além da aplicação de fotobiomodulação (808 nm; 30 mW; 100 J/cm²). O BG/COL/Mg + fotobiomodulação é composto por 10 animais com eutanásia no 15º dia pós-cirúrgico.

4.3.3. Modelo experimental de defeitos ósseos em tíbias de ratos

Inicialmente, os animais foram anestesiados com a associação de ketamina (80 mg/kg), xilazina (8 mg/kg), acepromazina (1 mg/kg) e fentanil (0,05 mg/kg). Os anestésicos e demais fármacos foram injetados via intraperitoneal com uma seringa do mesmo tipo da utilizada na aplicação de insulina. No pós-operatório, foram aplicados os seguintes fármacos pela via subcutânea: maxican (2 mg/kg) e cefalotina (60 mg/kg). O anti-inflamatório maxican foi aplicado de 24/24 horas durante 5 dias. Por um mesmo período de 5 dias e de 24/24 h, o tramadol também foi administrado em associação, via oral, e em gotas na água de beber (100 mg/ml). Além disso, durante o pós-operatório, os animais foram observados no que se refere à dificuldade de locomoção, sinais de estresse e monitoramento do peso. Quaisquer alterações nesses quesitos levaram a medidas para alívios dos mesmos, como, por exemplo, enriquecimento do ambiente (com guardanapo de papel e/ou rolos de papelão) e acesso a água/alimento facilitado.

Para a realização deste modelo experimental foi utilizada uma broca odontológica, marca MAILLEFER – Suíça, com 2 cm de comprimento e acionada por

um minidril com rotação de 13700 rpm e com fresca de 2,0 mm de diâmetro, irrigada com soro fisiológico para evitar queimadura do tecido ósseo (FAVARO-PIPI *et al.*, 2010). Após anestesia com ketamina/xilazina, tricotomia e assepsia da área a ser operada, foi realizada uma incisão no terço proximal da tíbia com a finalidade de expor a tíbia para a realização do defeito. O defeito (3 mm de diâmetro) foi realizado 10 mm abaixo da articulação do joelho com a broca na posição vertical e perpendicular ao eixo longitudinal do osso. Assim, o defeito foi realizado somente na cortical medial, sem atingir a face contralateral. Posteriormente a realização do defeito ósseo e colocação do respectivo implante, o músculo tibial anterior e pele foram suturados e, por final, foi realizada a limpeza do local. Os animais foram mantidos por algumas horas em ambiente aquecido para se evitar a hipotermia. Após, os animais foram acondicionados no biotério, em gaiolas com livre acesso à ração e água até o momento da eutanásia. O defeito ósseo foi realizado em ambas tíbias.

4.3.4. Colocação dos implantes

Os implantes foram colocados justapostos ao defeito ósseo imediatamente após a realização do mesmo, preenchendo completamente o defeito ósseo circular.

4.3.5. Eutanásia

Os animais foram eutanasiados, através de uma dose letal de Ketamina/Xilazina (285/30 mg/kg) após 15 dias dos procedimentos cirúrgicos, de acordo com cada grupo experimental. Subsequentemente à administração, a morte dos animais foi constatada através da identificação de batimento cardíaco e frequência respiratória, que deverão estar ausentes. Após, foi realizada a retirada cirúrgica das tíbias contendo os defeitos. Todo material coletado foi devidamente identificado e armazenado para processamento e utilização em análises posteriores.

5. ANÁLISES

As análises foram realizadas no departamento de Biociências da UNIFESP - campus Baixada Santista.

5.1. Análise histológica

A tíbia foi dissecada, fixada em formalina tamponada a 10% por 24 horas, lavada em água corrente por mais 24 horas e submetida à descalcificação em solução descalcificadora de EDTA 10% por aproximadamente 45 dias. Após a descalcificação óssea, o tecido foi lavado em água corrente por 24 horas e submetido ao processo de inclusão: álcool 80%, álcool 90%, álcool 100%, álcool 100%/ xilol 100% (1:1), xilol I 100%, xilol II 100%, xilol III 100%, paraplast I e paraplast II. O tecido permaneceu 1 hora em cada etapa, exceto na última (paraplast II), que foi overnight. Em seguida, foram confeccionadas lâminas com cortes semi-seriados de 5 µm de espessura e estes foram corados com hematoxilina e eosina (HE). Foi realizada uma análise qualitativa das lâminas, através da descrição morfológica do defeito e que avaliou os seguintes critérios: presença de processo inflamatório, tecido de granulação e neoformação óssea (osso primário e secundário).

5.2. Análise morfométrica

Após fixação, inclusão e confecção dos cortes (etapas descritas no item 5.1), as análises morfométricas foram realizadas de maneira quantitativa por um processo de quantificação da neoformação óssea presente na região do defeito. Para a realização deste processo, foram utilizadas as lâminas coradas com HE. Foi feita uma quantificação da neoformação óssea por toda a região do defeito, em % de formação óssea, pegando-se a área total do defeito por meio do programa de análise de imagem (OsteoMeasure®, OsteoMetrics, Decatur, USA) em aumento de 40x. Desta forma, os valores foram expressos em % de neoformação óssea e os resultados apresentados como a média da área total de tecido ósseo neoformado para cada espécime de cada grupo examinado.

5.3. Análise imunohistoquímica

Após o processo de fixação, inclusão e confecção dos cortes (etapas descritas no item 5.1), as análises imunohistoquímica foram desenvolvidas com objetivo de verificar a expressão dos fatores RUNX2 e RANKL (*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*).

As lâminas foram confeccionadas com uma espessura de 3 µm. Em seguida, estas foram desparafinizadas, hidratadas e, assim, realizado o processo de bloqueio da

peroxidase endógena. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário anti RUNX2 (código: sc-8566, Santa Cruz Biotechnology, USA) e anti RANKL (código: 7627, Santa Cruz Biotechnology, USA) por 24 horas. Posteriormente, os cortes foram incubados com anticorpo secundário por 30 minutos e revelados em DAB (3,3 diaminobenzidina – Sigma Chemical). Por último, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris. Após a marcação, as lâminas foram analisadas utilizando um aumento de 200x.

5.3.1. Análise qualitativa

As análises qualitativas das lâminas foram realizadas por dois observadores experientes em duplo-cego (HMC e PRGA). Com esta análise foi possível detectar a imunexpressão de marcadores osteogênicos e osteoclastogênicos, como RANK-L e RUNX-2, e seus locais de ocorrência.

5.3.2. Análise semi-quantitativa

As análises semi-quantitativas foram realizadas por dois observadores treinados (HMC e PRGA) a partir da padronização de escores para a imunomarcação (1 = ausente, 2 = leve, 3 = moderado e 4 = intenso). Estes escores foram adotados com base nos seguintes critérios: 1 – quando não houve imunomarcação; 2 – a quantidade de tecido imunomarcado variou de 1 a 35%; 3 – a quantidade de tecido imonomarcado variou de 36 a 65% e 4 – a quantidade de tecido imunomarcado variou de 66 a 100%; sendo, dessa maneira, avaliada a imunomarcação na região do defeito ósseo. Os observadores indicaram um valor para cada lâmina e, assim, foi realizada uma média entre estes valores. Os dados foram expressos em média e desvio padrão da média (TIM *et al.*, 2014).

6. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados foram analisados estatisticamente através das técnicas descritivas, tais como, tabelas e gráficos, sendo os valores expressos em média e desvio padrão da média. A distribuição das variáveis foi testada utilizando o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para as variações classificadas dentro da distribuição normal (paramétricas), utilizou-se o teste ANOVA com post hoc de Tukey. Para as variações classificadas não paramétricas, utilizou-se o teste Kruskal-Wallis com post hoc de Dunn. O nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0.05$). Todas as análises foram realizadas no programa estatístico GraphPad Prism versão 6.0.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1. Análise Histológica

A análise histológica qualitativa dos implantes tibiais de BG/Mg e BG/Col/Mg, 15 dias após a cirurgia, indicou uma degradação inicial do biomaterial, acompanhada de neoformação óssea, principalmente, na periferia do defeito ósseo (Figuras 1A e 1B). A linha do defeito ainda pode ser observada, podendo isto estar relacionado ao fato de ainda se tratar de uma formação óssea imatura. Fragmentos do biomaterial foram encontrados preenchendo o defeito, além dos mesmos estarem presentes entre as trabéculas ósseas. Tecido de granulação e tecido medular também foram observados em algumas regiões da lesão (Figuras 1A e 2B).

Seguindo a mesma linha, a análise histológica para o grupo BG/Mg + fotobiomodulação e BG/Col/Mg + fotobiomodulação, após 15 dias de implantação, mostrou um padrão semelhante ao encontrado para os grupos sem associação com a fotobiomodulação. Dessa maneira, foi observada uma degradação inicial do material, além de osso neoformado na periferia do defeito (Figuras 1C e 1D). A linha do defeito também pôde ser observada, separando a cortical saudável da região de defeito induzido, sendo que esta última ainda era formada por osso imaturo. Partículas do material ainda podiam ser encontradas em diferentes partes do defeito, no entanto, de maneira menos acentuada nos grupos com fotobiomodulação quando comparados aos grupos não associados a este recurso terapêutico. Vale ressaltar que também foi encontrado um tecido de granulação mais evidente e organizado nos grupos associados a fotobiomodulação comparados aos não associados (Figuras 1C e 1D).

De acordo com tais achados, Fernandes *et al.* (2017) demonstraram que a associação de compósitos de Biosilicato/PLGA com fotobiomodulação (Ga-Al-As, 808 nm, 10 J/cm²) levou a uma maior degradação do material, além de um aumento do tecido de granulação em defeitos ósseos tibiais de ratos (FERNANDES *et al.*, 2017). Em outro estudo, análises histopatológicas indicaram que a fotobiomodulação (Ga-Al-As, 830 nm, 2,8 J) foi capaz de estimular a deposição de tecido de granulação no sítio da lesão (TIM *et al.*, 2016). Bossini e colaboradores verificaram que grupos de ratas osteopênicas, submetidas a cirurgias para defeito ósseos tibiais e tratadas com fotobiomodulação em duas diferentes doses (60 e 120 J/cm²), apresentaram maior quantidade de tecido de granulação comparada ao controle.

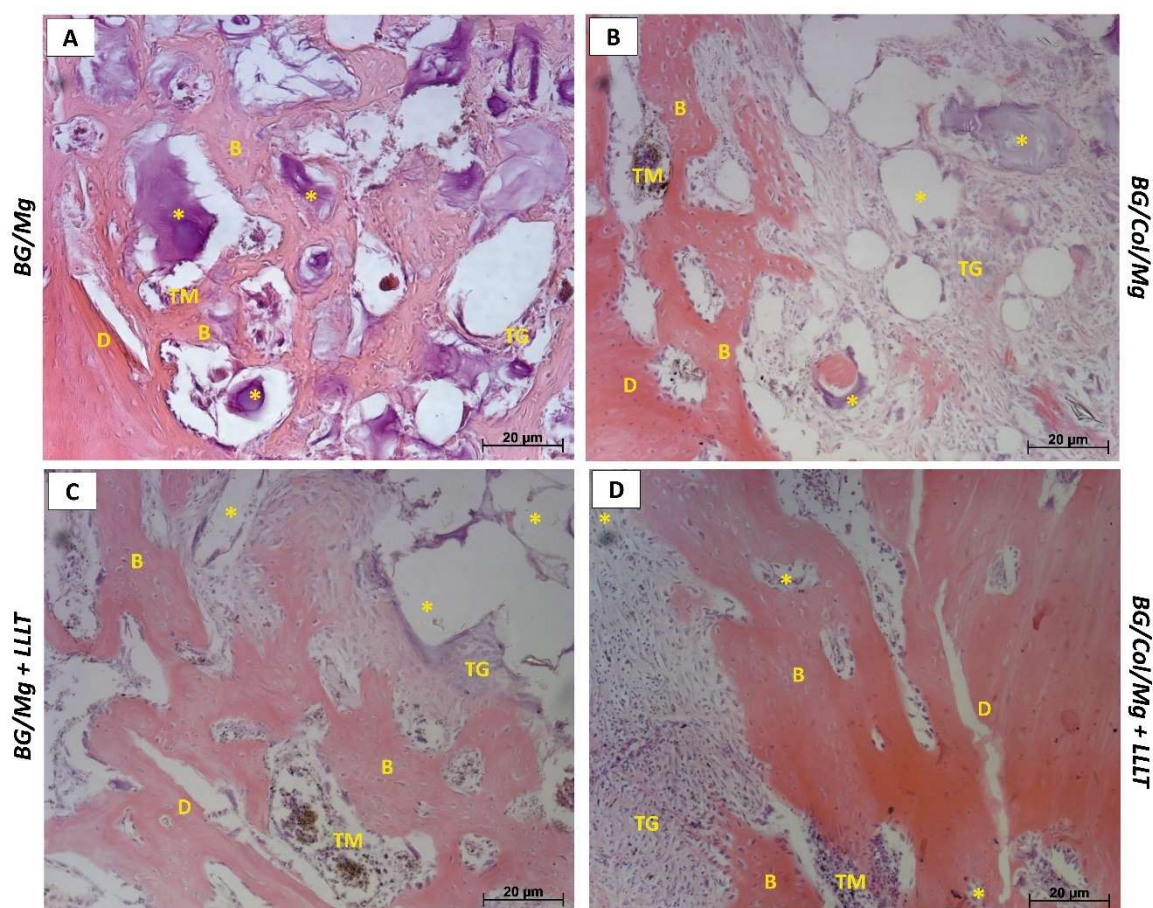


Figura 1. Fotos histológicas representativas dos grupos BG/Mg 15 dias (A); BG/Col/Mg (B); BG/Mg + fotobiomodulação (C); BG/Col/Mg + fotobiomodulação (D). * Materiais, B Bone - osso neoformado, D linha do Defeito, TG Tecido de Granulação, TM Tecido Medular. Coloração hematoxilina-eosina em aumento de 200x.

Sabe-se que a fotobiomodulação é capaz de estimular o metabolismo da região onde foi aplicado (ACAR *et al.*, 2016), acelerando, no caso, a degradação dos compósitos de BG/Col/Mg e formação do tecido de granulação. Isto poderá levar também ao aumento na rapidez da consolidação da fratura, visto que a degradação do biomaterial é crucial para liberação de espaço e substituição por tecido ósseo neoformado (LU *et al.*, 2005). Assim, períodos mais longos de implantação do biomaterial, associado a aplicação da fotobiomodulação, são necessários para se elucidar essa questão.

7.2. Análise morfométrica

Os dados de morfometria óssea quantitativa são apresentados na Figura 2. Os grupos analisados apresentaram valores de neoformação óssea entre ~ 18 e 22 %. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos analisados no período

avaliado ($p > 0.05$; Figura 2). Magri *et al.* (2017) também não encontrou ganho significativo na porcentagem de formação óssea ao se comparar biovidro ao biovidro combinado ao colágeno, com achados histológicos similares para ambos os grupos na região da lesão (MAGRI *et al.*, 2017).

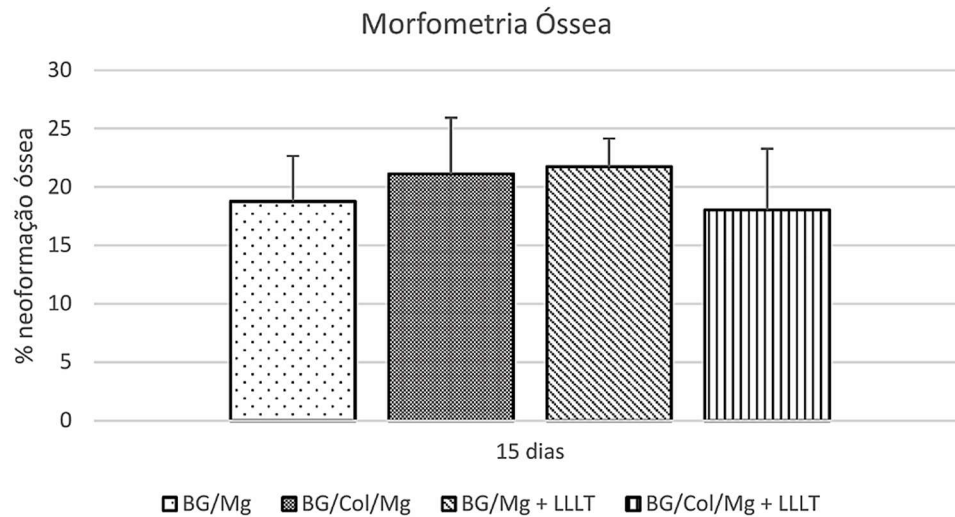


Figura 2. Dados de morfometria para os compósitos investigados no estudo ($p > 0.05$).

Outro ponto é que a fotobiomodulação não foi capaz de modular o efeito dos compósitos de BG/Col/Mg no reparo ósseo. Zambone Pinto e co-autores também verificaram que a terapia com fotobiomodulação não foi capaz de aumentar a bioatividade da vitrocerâmica Biosilicato (PINTO *et al.*, 2013). Em contraste, alguns estudos prévios indicam que a associação de biomateriais a fotobiomodulação levaram a um aumento da neoformação óssea (FANGEL *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2017). Sugere-se que os parâmetros de fotobiomodulação utilizados nesse estudo não foram capazes de oferecer um estímulo extra para a aceleração do reparo ósseo.

7.3. Análise imunohistoquímica

7.3.1. Análise qualitativa

A imunomarcagem para RUNX2, no caso dos grupos BG/Mg e BG/Col/Mg, foi detectada por todo o defeito, principalmente nas bordas do tecido ósseo neoformado e no tecido de granulação (Figuras 3A e 3B). A imunoexpressão desse fator também foi encontrada nas amostras cujo tecido medular ainda pôde ser observado. Para os grupos BG/Mg + fotobiomodulação e BG/Col/Mg + fotobiomodulação, a marcação para RUNX2 foi verificada no osso neoformado e em células osteoblásticas (Figuras 3C e

3D). O tecido medular remanescente e o de granulação também foram imunomarcados por tal fator.

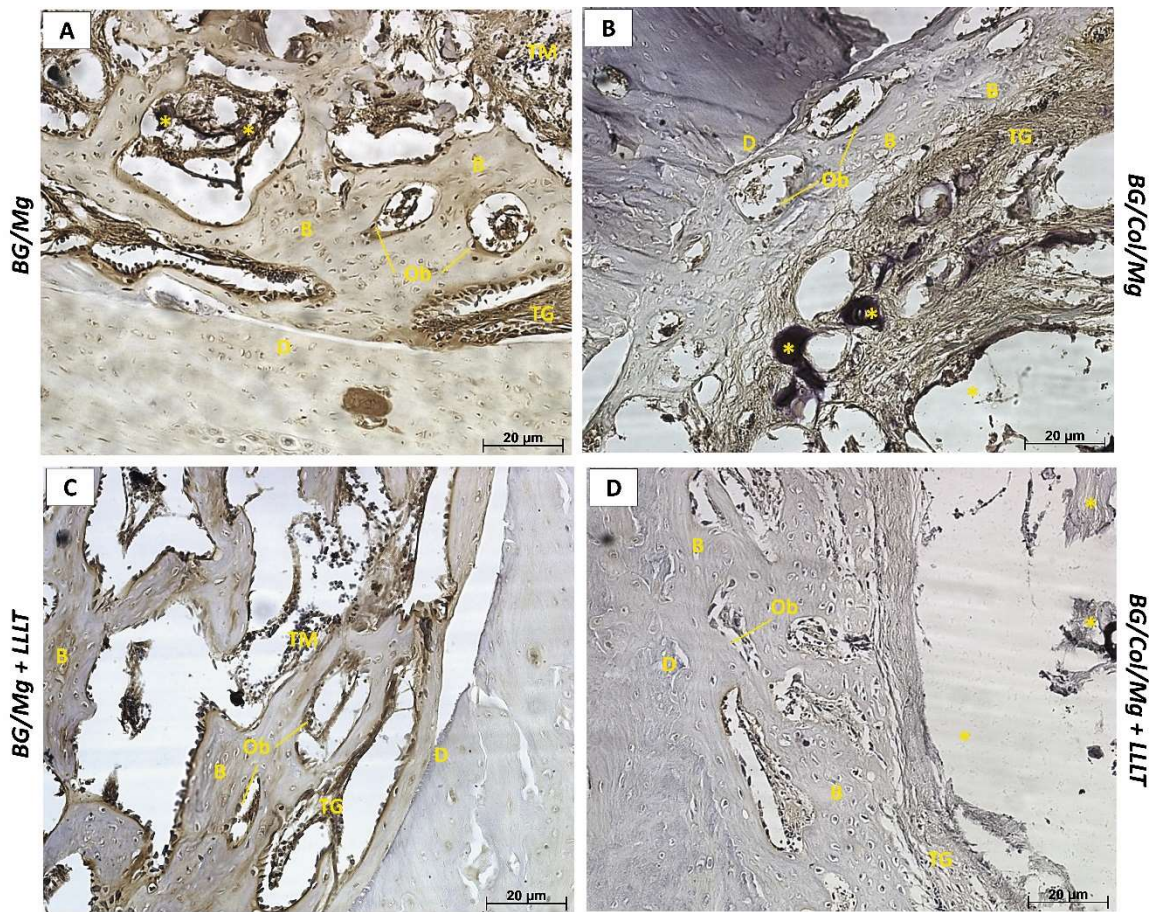


Figura 3. Fotos representativas para imunohistoquímica de RUNX2 dos grupos BG/Mg (A); BG/Col/Mg (B); BG/Mg + fotobiomodulação (C); BG/Col/Mg + fotobiomodulação (D). * Materiais, B Bone - osso neoformado, D linha do Defeito, TG Tecido de Granulação, TM Tecido Medular, Ob osteoblasto. Aumento de 200x.

As imunomarcações para RUNX2 foram detectadas em todos os grupos. Sabe-se que o RUNX2 é fundamental para o *upregulation* de marcadores osteoblásticos, como, osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina, influenciando a diferenciação de osteoblastos e, por consequência, a deposição e formação óssea (AFZAL, POLAK e BUTTERY, 2004). A detecção do fator RUNX2 nesse estudo está de acordo com estudos *in vivo* prévios que verificaram a imunoexpressão de RUNX2 em diferentes modelos de defeitos ósseos preenchidos com biomateriais (BOSSINI *et al.*, 2011; MATSUMOTO *et al.*, 2012; GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015).

No que se refere a imunoexpressão para RANKL após 15 dias de implantação, tanto nos grupos BG/Mg e BG/Col/Mg (Figura 4A e 4B) quanto nos grupos associados

a fotobiomodulação (Figura 4C e 4D), tal fator foi observado mais, evidentemente, no osso recém-formado entre as partículas do biomaterial, quando estas se faziam presentes, além de nos tecidos medular e de granulação.

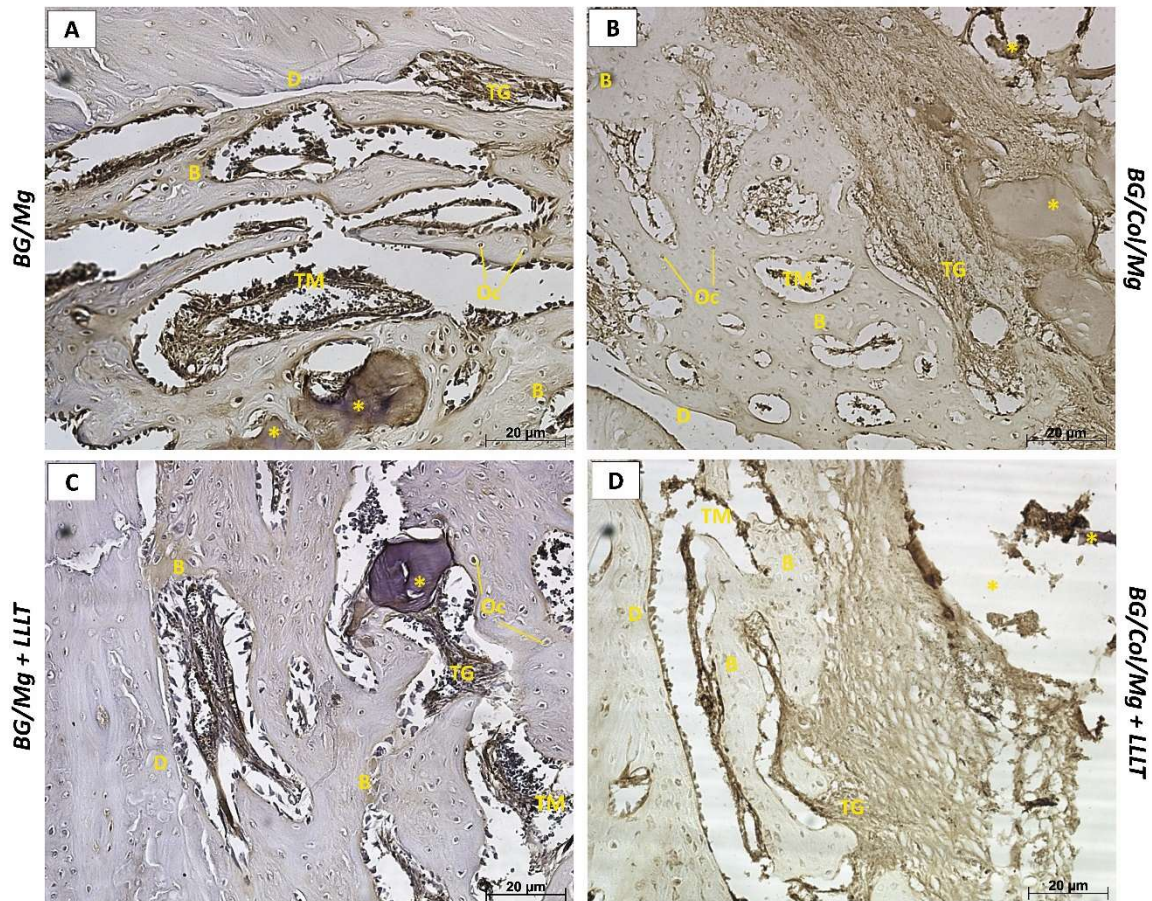


Figura 4. Fotos representativas para imunohistoquímica de RANKL dos grupos BG/Mg (A); BG/Col/Mg (B); BG/Mg + fotobiomodulação (C); BG/Col/Mg + fotobiomodulação (D). * Materiais, B Bone - osso neoformado, D linha do Defeito, TG Tecido de Granulação, TM Tecido Medular, Oc osteócito. Aumento de 200x.

A imunoexpressão para RANKL foi verificada em todos os grupos avaliados. O RANKL tem um papel central para diferenciação e ativação de osteoclastos. Tais células são essenciais para o remodelamento ósseo, sendo esse evento necessário durante o processo de reparo (KEARNS, KHOSLA e KOSTENIUK, 2008; ANANDARAJAH e SCHWARZ, 2009). Estudos conduzidos por Gabbai-Armelin e colaboradores também demonstraram a imunoexpressão de RANKL em defeitos ósseos tibiais tratados com um novo material vítreo-fibroso (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015). De acordo com os achados do presente trabalho, Magri *et al.* (2017) também detectaram a imunomarcagem para RANKL no tecido ósseo neoformado e tecido de

granulação nos sítios de lesão, os quais foram tratados, por sua vez, com duas formas diferentes de biovidro (pó e fibras) (MAGRI *et al.*, 2017).

7.3.2. Análise semi-quantitativa

Os dados para análise semi-quantitativa de RUNX2 são apresentados na Figura 5. Os grupos avaliados tiveram valores de imunomarcação, na região do defeito, para o RUNX2 entre 2,5 e 3,0, o que indica uma marcação entre leve e moderada. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos analisados no período avaliado ($p > 0.05$; Figura 5).

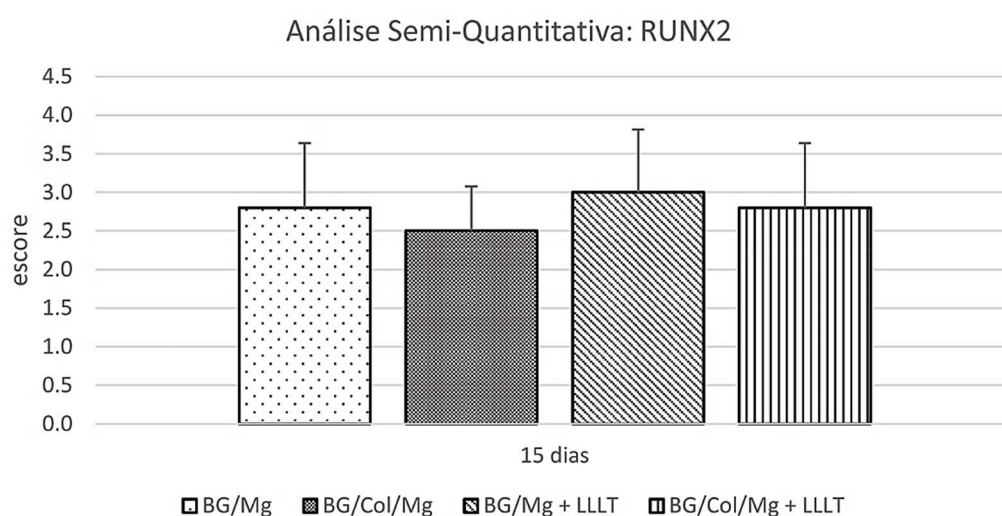


Figura 5. Análise semi-quantitativa para RUNX2 dos compósitos investigados no estudo ($p > 0.05$).

O gráfico para análise semi-quantitativa de RANKL está representado na Figura 6. De maneira similar ao fator previamente investigado, os grupos estudados tiveram valores de imunomarcação para o RANKL entre 2,2 e 3,0, indicando uma marcação entre leve e moderada. Nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos analisados ($p > 0.05$; Figura 6).

De acordo com os achados de imunomarcação de leve a moderada tanto para RUNX2 quanto RANKL deste trabalho, estão alguns estudos prévios, os quais investigaram biomateriais (*scaffold* vítreo fibroso e Biosilicato) implantados em defeitos tibiais em ratos e também detectaram esse padrão de marcação após 15 dias de implantação (PINTO *et al.*, 2013; GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015).

Embora não foi encontrada diferença estatística entre os grupos avaliados, pode-se notar uma tendência de maior imunomarcação para RUNX2 e RANKL nos grupos BG/Mg associados ou não a fotobiomodulação quando comparados aos BG/Col/Mg.

Sugere-se que a bioatividade do BG (XYNOS *et al.*, 2000; HENCH e WILSON, 2013), muito provavelmente, exerceu mais influência sobre a expressão desses fatores do que, propriamente, o componente colagênico (SUN *et al.*, 2014). Por final, pode-se dizer que os parâmetros de fotobiomodulação do presente estudo não foram suficientes, inicialmente, para modular a expressão de marcadores osteogênicos.

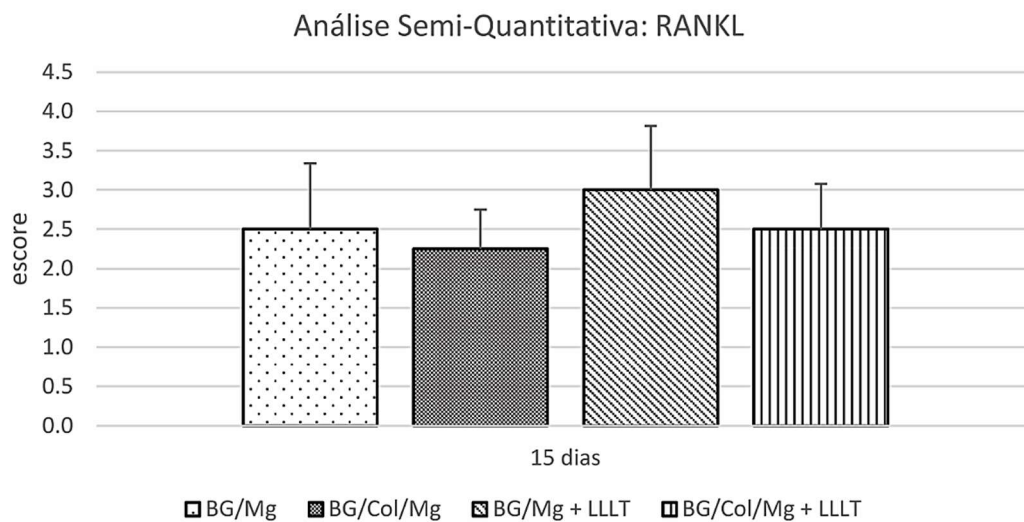


Figura 6. Análise semi-quantitativa para RANKL dos compósitos investigados no estudo ($p > 0.05$).

Com base nas análises, nota-se que os compósitos de BG/Col/Mg apresentaram uma degradação inicial, acompanhada da formação do tecido de granulação, expressão de fatores osteogênicos e substituição por tecido ósseo. Além disso, a degradação dos biomateriais e o tecido de granulação foram mais evidentes nos grupos associados a fotobiomodulação. Estudos adicionais devem ser feitos, utilizando outros modelos experimentais, como, por exemplo, defeitos de tamanho crítico (*Critical-Size Defects*, CSDs), os quais não conseguem se consolidar espontaneamente (COOPER *et al.*, 2010).

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, pode-se dizer que compósitos de BG/Col/Mg foram obtidos com sucesso e implantados em defeitos ósseos tibiais de ratos. As imunomarcações para RUNX2 e RANKL foram detectadas em todos os grupos. Embora foi observado que a fotobiomodulação não foi capaz de, inicialmente, modular os efeitos de tais compósitos em termos de morfometria óssea e expressão de fatores osteogênicos, pode-se dizer que a associação a essa fototerapia teve um efeito benéfico, levando a degradação do biomaterial e substituição do mesmo por um tecido de granulação organizado. Estudos futuros devem ser realizados, utilizando períodos experimentais mais longos, para se verificar e elucidar os efeitos da combinação da fotobiomodulação com compósitos de BG/Col/Mg sobre o reparo ósseo.

9. REFERÊNCIAS

AARON, R. K., CIOMBOR, D. M. e SIMON, B. J. Treatment of nonunions with electric and electromagnetic fields. **Clin Orthop Relat Res**, p.21-9. 2004.

ACAR, AHMET HÜSEYİN, YOLCU, ÜMIT, ALTINDIŞ, SEDAT, GÜL, MEHMET, ALAN, HILAL e MALKOÇ, SİDDİK. Bone regeneration by low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound therapy in the rabbit calvarium. **Archives of Oral Biology**, v.61, p.60-65. 2016.

AFZAL, F., POLAK, J. e BUTTERY, L. Endothelial nitric oxide synthase in the control of osteoblastic mineralizing activity and bone integrity. **J Pathol**, v.202, p.503-10. 2004.

ANANDARAJAH, A. P. e SCHWARZ, E. M. Bone loss in the spondyloarthropathies: role of osteoclast, RANKL, RANK and OPG in the spondyloarthropathies. **Adv Exp Med Biol**, v.649, p.85-99. 2009.

ASSIS, L., MORETTI, A. I., ABRAHAO, T. B., DE SOUZA, H. P., HAMBLIN, M. R. e PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (808 nm) contributes to muscle regeneration and prevents fibrosis in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. **Fotobiomodulações Med Sci**, v.28, p.947-55. 2013.

BOSSINI, P. S., FANGEL, R., HABENSCHUS, R. M., RENNO, A. C., BENZE, B., ZUANON, J. A., NETO, C. B. e PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy (670 nm) on viability of random skin flap in rats. **Fotobiomodulações Med Sci**, v.24, p.209-13. 2009.

BOSSINI, P. S., RENNO, A. C., RIBEIRO, D. A., FANGEL, R., PEITL, O., ZANOTTO, E. D. e PARIZOTTO, N. A. Biosilicate(R) and low-level laser therapy improve bone repair in osteoporotic rats. **J Tissue Eng Regen Med**, v.5, p.229-37. 2011.

BOSSINI, P. S., RENNO, A. C., RIBEIRO, D. A., FANGEL, R., RIBEIRO, A. C., LAHOZ MDE, A. e PARIZOTTO, N. A. Low level laser therapy (830nm) improves bone repair in osteoporotic rats: similar outcomes at two different dosages. **Exp Gerontol**, v.47, p.136-42. 2012.

- CALORI, G. M., ALBISETTI, W., AGUS, A., IORI, S. e TAGLIABUE, L. Risk factors contributing to fracture non-unions. **Injury**, v.38 Suppl 2, p.S11-8. 2007.
- CHEN, Q., ROETHER, J. A. e BOCCACCINI, A. R. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials. In: R. R. N Ashammakhi, & F Chiellini (Ed.). Topics in Tissue Engineering, v.4, 2008. Tissue Engineering Scaffolds from Bioactive Glass and Composite Materials
- COOPER, GREGORY M., MOONEY, MARK P., GOSAIN, ARUN K., CAMPBELL, PHIL G., LOSEE, JOSEPH E. e HUARD, JOHNNY. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). **Plastic and reconstructive surgery**, v.125, p.1685-1692. 2010.
- COORDS, M., BREITBART, E., PAGLIA, D., KAPPY, N., GANDHI, A., COTTRELL, J., CEDENO, N., POUNDER, N., O'CONNOR, J. P. e LIN, S. S. The effects of low-intensity pulsed ultrasound upon diabetic fracture healing. **J Orthop Res**, v.29, p.181-8. 2011.
- FANGEL, R., BOSSINI, P. S., RENNO, A. C., RIBEIRO, D. A., WANG, C. C., TOMA, R. L., NONAKA, K. O., DRIUSSO, P., PARIZOTTO, N. A. e OISHI, J. Low-level laser therapy, at 60 J/cm² associated with a Biosilicate((R)) increase in bone deposition and indentation biomechanical properties of callus in osteopenic rats. **J Biomed Opt**, v.16, p.078001. 2011.
- FAVARO-PIPI, E., FEITOSA, S. M., RIBEIRO, D. A., BOSSINI, P., OLIVEIRA, P., PARIZOTTO, N. A. e RENNO, A. C. Comparative study of the effects of low-intensity pulsed ultrasound and low-level laser therapy on bone defects in tibias of rats. **Fotobiomodulações Med Sci**, v.25, p.727-32. 2010.
- FAVARO-PIPI, E., RIBEIRO, D. A., RIBEIRO, J. U., BOSSINI, P., OLIVEIRA, P., PARIZOTTO, N. A., TIM, C., DE ARAUJO, H. S. e RENNO, A. C. Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats. **Photomed laser Surg**, v.29, p.311-7. 2011.
- FERNANDES, K. R., MAGRI, A. M. P., KIDO, H. W., PARISI, J. R., ASSIS, L., FERNANDES, K. P. S., MESQUITA-FERRARI, R. A., MARTINS, V. C., PLEPIS, A. M., ZANOTTO, E. D., PEITL, O. e RENNO, A. C. M. Biosilicate/PLGA osteogenic effects modulated by laser therapy: In vitro and in vivo studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.173, p.258-265. 2017.
- FERNANDES, K. R., RIBEIRO, D. A., RODRIGUES, N. C., TIM, C., SANTOS, A. A., PARIZOTTO, N. A., DE ARAUJO, H. S., DRIUSSO, P. e RENNO, A. C. Effects of low-level laser therapy on the expression of osteogenic genes related in the initial stages of bone defects in rats. **J Biomed Opt**, v.18, p.038002. 2013.

FREDDO, A. L., RODRIGO, S. M., MASSOTTI, F. P., ETGES, A. e DE OLIVEIRA, M. G. Effect of low-level laser therapy after implantation of poly-L-lactic/polyglycolic acid in the femurs of rats. **Fotobiomodulações Med Sci**, v.24, p.721-8. 2009.

FUJISHIRO, Y., HENCH, L. L. e OONISHI, H. Quantitative rates of in vivo bone generation for Bioglass and hydroxyapatite particles as bone graft substitute. **J Mater Sci Mater Med**, v.8, p.649-52. 1997.

GABBAI-ARMELIN, P. R., SOUZA, M. T., KIDO, H. W., TIM, C. R., BOSSINI, P. S., MAGRI, A. M., FERNANDES, K. R., PASTOR, F. A., ZANOTTO, E. D., PARIZOTTO, N. A., PEITL, O. e RENNO, A. C. Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **J Mater Sci Mater Med**, v.26, p.177. 2015.

HADJIARGYROU, M., MCLEOD, K., RYABY, J. P. e RUBIN, C. Enhancement of fracture healing by low intensity ultrasound. **Clin Orthop Relat Res**, p.S216-29. 1998.

HAN, H. S., MINGHUI, Y., SEOK, H. K., BYUN, J. Y., CHA, P. R., YANG, S. J. e KIM, Y. C. The modification of microstructure to improve the biodegradation and mechanical properties of a biodegradable Mg alloy. **J Mech Behav Biomed Mater**, v.20, p.54-60. 2013.

HENCH, L. L. The story of Bioglass. **J Mater Sci Mater Med**, v.17, p.967-78. 2006.

HENCH, L. L. e POLAK, J. M. Third-generation biomedical materials. **Science**, v.295, p.1014-7. 2002.

HENCH, L.L. e WILSON, J. An Introduction to Bioceramics. London, U.K: Imperial College Press. 2013. 620 p.

HUAN, Z., LEEFLANG, S., ZHOU, J., ZHAI, W., CHANG, J. e DUSZCZYK, J. In vitro degradation behavior and bioactivity of magnesium-Bioglass((R)) composites for orthopedic applications. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v.100, p.437-46. 2012.

JING, D., CAI, J., SHEN, G., HUANG, J., LI, F., LI, J., LU, L., LUO, E. e XU, Q. The preventive effects of pulsed electromagnetic fields on diabetic bone loss in streptozotocin-treated rats. **Osteoporos Int**, v.22, p.1885-95. 2011.

KARAGEORGIU, V. e KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v.26, p.5474-91. 2005.

KEARNS, A. E., KHOSLA, S. e KOSTENIUK, P. J. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. **Endocr Rev**, v.29, p.155-92. 2008.

KROON, MARTIN. On the correlation between continuum mechanics entities and cell activity in biological soft tissues: Assessment of three possible criteria for cell-controlled fibre reorientation in collagen gels and collagenous tissues. **Journal of Theoretical Biology**, v.264, p.66-76. 2010.

KWAK, H. B. Aging, exercise, and extracellular matrix in the heart. **J Exerc Rehabil**, v.9, p.338-47. 2013.

LU, HELEN H., TANG, AMY, OH, SEONG CHEOL, SPALAZZI, JEFFREY P. e DIONISIO, KATHIE. Compositional effects on the formation of a calcium phosphate layer and the response of osteoblast-like cells on polymer-bioactive glass composites. **Biomaterials**, v.26, p.6323-6334. 2005.

MAGRI, ANGELA MARIA PAIVA, FERNANDES, KELLY ROSSETTI, UENO, FABIO ROBERTO, KIDO, HUELITON WILIAN, DA SILVA, ANTONIO CARLOS, BRAGA, FRANCISCO JOSÉ CORREA, GRANITO, RENATA NEVES, GABBAI-ARMELIN, PAULO ROBERTO e RENNÓ, ANA CLAUDIA MUNIZ. Osteoconductive properties of two different bioactive glass forms (powder and fiber) combined with collagen. **Applied Surface Science**. 2017.

MATSUMOTO, M. A., CAVIQUIOLI, G., BIGUETTI, C. C., HOLGADO LDE, A., SARAIVA, P. P., RENNO, A. C. e KAWAKAMI, R. Y. A novel bioactive vitroceramic presents similar biological responses as autogenous bone grafts. **J Mater Sci Mater Med**, v.23, p.1447-56. 2012.

MOURA, J., TEIXEIRA, L. N., RAVAGNANI, C., PEITL, O., ZANOTTO, E. D., BELOTI, M. M., PANZERI, H., ROSA, A. L. e DE OLIVEIRA, P. T. In vitro osteogenesis on a highly bioactive glass-ceramic (Biosilicate). **J Biomed Mater Res A**, v.82, p.545-57. 2007.

NAVARRO, M., DEL VALLE, S., MARTINEZ, S., ZEPPELELLI, S., AMBROSIO, L., PLANELL, J. A. e GINEBRA, M. P. New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. **Biomaterials**, v.25, p.4233-41. 2004.

OH, J. H., KIM, H. J., KIM, T. I. e WOO, K. M. Comparative evaluation of the biological properties of fibrin for bone regeneration. **BMB Rep**, v.47, p.110-4. 2014.

PATROCINIO-SILVA, T. L., DE SOUZA, A. M., GOULART, R. L., PEGORARI, C. F., OLIVEIRA, J. R., FERNANDES, K., MAGRI, A., PEREIRA, R. M., ARAKI, D. R., NAGAOKA, M. R., PARIZOTTO, N. A. e RENNO, A. C. The effects of low-level laser irradiation on bone tissue in diabetic rats. **Fotobiomodulações Med Sci**, v.29, p.1357-64. 2014.

- PINTO, K. N., TIM, C. R., CROVACE, M. C., MATSUMOTO, M. A., PARIZOTTO, N. A., ZANOTTO, E. D., PEITL, O. e RENNO, A. C. Effects of biosilicate((R)) scaffolds and low-level laser therapy on the process of bone healing. **Photomed laser Surg**, v.31, p.252-60. 2013.
- RENNO, A. C., MCDONNELL, P. A., CAMURI CROVACE, M., ZANOTTO, E. D. e LAAKSO, E. L. Effect of 830-nm laser phototherapy on olfactory neuronal ensheathing cells grown in vitro on novel bioscaffolds. **J Appl Biomater Funct Mater**, v.13, p.e234-40. 2015.
- RENNO, A. C., MCDONNELL, P. A., PARIZOTTO, N. A. e LAAKSO, E. L. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. **Photomed laser Surg**, v.25, p.275-80. 2007.
- SCHINDELER, A., MCDONALD, M. M., BOKKO, P. e LITTLE, D. G. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. **Semin Cell Dev Biol**, v.19, p.459-66. 2008.
- SEZER, U., ELTAS, A., USTUN, K., SENYURT, S. Z., ERCIYAS, K. e ARAS, M. H. Effects of low-level laser therapy as an adjunct to standard therapy in acute pericoronitis, and its impact on oral health-related quality of life. **Photomed laser Surg**, v.30, p.592-7. 2012.
- SHYNG, Y. C., CHI, C. Y., DEVLIN, H. e SLOAN, P. Healing of tooth extraction sockets in the streptozotocin diabetic rat model: Induction of cartilage by BMP-6. **Growth Factors**, v.28, p.447-51. 2010.
- SUN, H., ZHU, F., HU, Q. e KREBSBACH, P. H. Controlling stem cell-mediated bone regeneration through tailored mechanical properties of collagen scaffolds. **Biomaterials**, v.35, p.1176-84. 2014.
- TIM, C. R., BOSSINI, P. S., KIDO, H. W., MALAVAZI, I., VON ZESKA KRESS, M. R., CARAZZOLLE, M. F., RENNO, A. C. e PARIZOTTO, N. A. Low-level laser therapy induces an upregulation of collagen gene expression during the initial process of bone healing: a microarray analysis. **J Biomed Opt**, v.21, p.88001. 2016.
- TIM, C. R., PINTO, K. N., ROSSI, B. R., FERNANDES, K., MATSUMOTO, M. A., PARIZOTTO, N. A. e RENNO, A. C. Low-level laser therapy enhances the expression of osteogenic factors during bone repair in rats. **Fotobiomodulações Med Sci**, v.29, p.147-56. 2014.
- TSIRIDIS, E., UPADHYAY, N. e GIANNOUDIS, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? **Injury**, v.38 Suppl 1, p.S11-25. 2007.

WHEELER, T. S., SBRAVATI, N. D. e JANORKAR, A. V. Mechanical & cell culture properties of elastin-like polypeptide, collagen, bioglass, and carbon nanosphere composites. **Ann Biomed Eng**, v.41, p.2042-55. 2013.

WIESE, ANDREA e PAPE, HANS C. Bone Defects Caused by High-energy Injuries, Bone Loss, Infected Nonunions, and Nonunions. **Orthopedic Clinics of North America**, v.41, p.1-4. 2010.

WITTE, F., KAESE, V., HAUSERKAMP, H., SWITZER, E., MEYER-LINDENBERG, A., WIRTH, C. J. e WINDHAGEN, H. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response. **Biomaterials**, v.26, p.3557-3563. 2005.

XYNOS, I. D., EDGAR, A. J., BUTTERY, L. D., HENCH, L. L. e POLAK, J. M. Ionic products of bioactive glass dissolution increase proliferation of human osteoblasts and induce insulin-like growth factor II mRNA expression and protein synthesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.276, p.461-5. 2000.